

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experiment*. Terdapat 3 variabel di dalam penelitian ini, yaitu variabel bebas (dosis terapi), variabel tergantung (kadar glukosa darah), dan variabel kontrol (*Rattus norvegicus*) Sampel di dalam penelitian ini akan dipilih *random*. Sampel akan dibagi ke dalam 6 kelompok yaitu kelompok sehat, kontrol positif, kontrol negatif, Perlakuan I, Perlakuan II, dan Perlakuan III. Pengukuran kadar glukosa darah total dilakukan secara *post test only control group design*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Ekstraksi Tanaman

Ekstraksi dilakukan di laboratorium Fitofarmaka Materia Medika kota Batu, dan Laboratorium Sintesis Jurusan Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang. Waktu penelitian yaitu pada Februari-Maret 2018.

4.2.2 Pengujian Aktivitas

Pengujian sampel dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran UMM, dan Laboratorium Patologi Klinik Universitas Brawijaya untuk dilakukan pemeriksaan parameter glukosa darah *Rattus norvegicus* diabetes. Waktu pelaksanaan kegiatan pada bulan April hingga bulan Mei 2018.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus putih jantan galur wistar, *Rattus norvegicus* dengan berat badan 200 g dengan usia 2 bulan. Tikus yang digunakan adalah tikus sehat yang ditandai dengan perilaku normal dan diadaptasikan selama 1 minggu untuk menyesuaikan kondisi keadaan setempat (laboratorium) sebagai hewan coba (Ratnawati, et al., 2014) (BPOM).

4.3.2 Sampel dan Besar Sampel

Kriteria inklusi dalam penelitian ini yaitu *Rattus norvegicus* dalam keadaan sehat, memiliki berat badan antara 150-200 gram atau berusia sekitar 3-4 gram dengan jenis kelamin jantan. Sedangkan kriteria eksklusi pada penelitian ini yaitu jika *Rattus norvegicus* sakit dengan rambut yang rontok, gerak kurang aktif,

adanya cairan tidak normal dari anus, genital, mulut, ataupun mata. Berat badan berkurang $> 10\%$ setelah masa adaptasi.

Di dalam penelitian eksperimental, untuk menentukan berapa banyak jumlah sampel yang akan digunakan dapat ditung dengan rumus Federer dengan (t) adalah jumlah perlakuan dan (n) adalah replikas jumlah sampel (Salim, 2013) :

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Dari rumus tersebut didapatkan hasil perhitungan, yaitu terdapat enam kelompok perlakuan dengan 4 ekor hewan uji di dalam masing-masing kelompok sebagai jumlah sampel atau replikasi (Gani, et al, 2013).

4.4 Alat dan Bahan

4.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam pengujian sebagai berikut :

- a. Timbangan untuk menimbang berat badan tikus
- b. Timbangan untuk menimbang ekstrak
- c. Tempat makan tikus
- d. Kandang tikus
- e. Penutup kandang dari anyaman kawat
- f. Botol air
- g. Gelas ukur
- h. Erlenmeyer
- i. Cawan porselin
- j. Batang pengaduk
- k. Corong gelas
- l. Spektrofotometer Uv-Vis
- m. Sentrifuge
- n. Pipet tetes

- o. Kuvet
- p. Sonde
- q. Spuit
- r. Kapas
- s. Alat cek kadar gula darah dan kolesterol
- t. Stick untuk pengecekan kadar gula darah dan kolesterol
- u. Oven

4.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam pengujian dalam pengujian sebagai berikut :

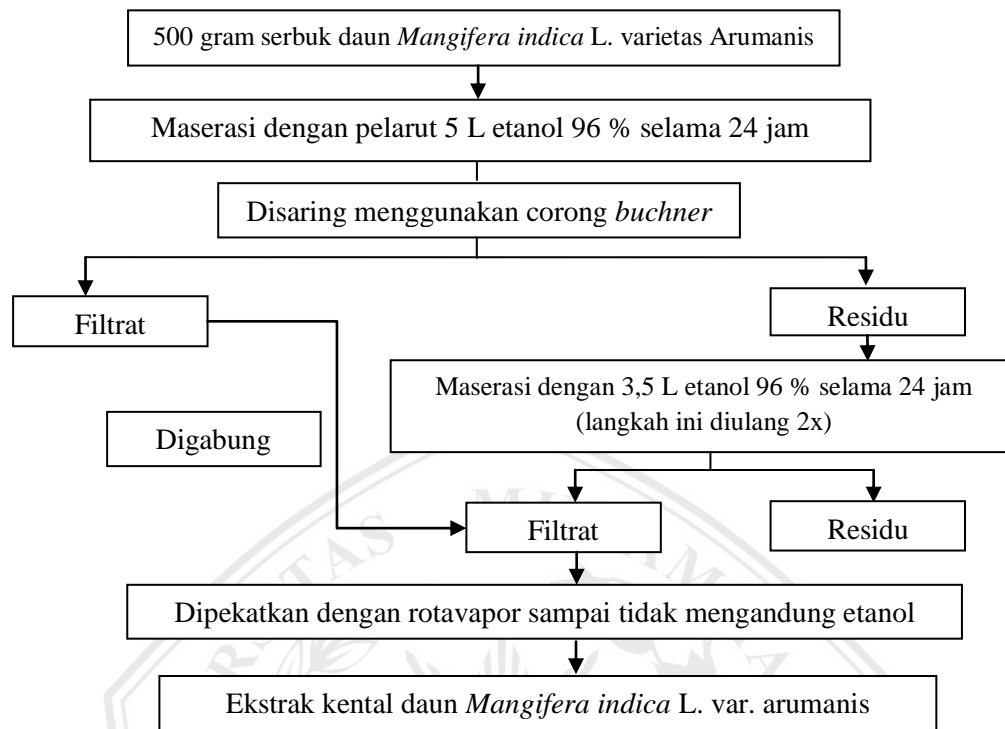
- a. Hewan percobaan
- b. Aquadest
- c. Simplisia daun *Mangifera indica* dan *Syzygium polyanthum*
- d. Ekstrak daun *Mangifera indica* dan *Syzygium polyanthum*
- e. Etanol 96%
- f. CMC Na
- g. Glibenklamid
- h. Pakan standar
- i. Reagen GOD-PAP

4.5 Prosedur Pengumpulan Data

4.5.1 Ekstraksi Daun *Mangifera indica* L.

Daun *Mangifera indica* dibersihkan, dikeringkan di bawah naungan dihaluskan menjadi serbuk simplisia, dan ditimbang sebanyak 500 mg. Dilakukan maserasi selama 24 jam di dalam bejana dengan merendamnya di dalam pelarut etanol 96% 5 L. Rendaman disaring dengan corong *buchner* yang dipisahkan antara filtrat dan residunya di dalam wadah berbeda. Lakukan maserasi kembali selama 24 jam pada residu dengan menambahkan etanol 96% 3,5 L, lakukan maserasi hingga penyaringan kembali sebanyak dua kali. Seluruh filtrat digabungkan dari setiap proses maserasi dan dilakukan pemekatan dengan *rotary evaporator* dengan parameter proses pemekatan pada suhu 60°C, titik didih 40°C, dan tekanan 175 mbar untuk mendapatkan ekstrak kental daun *Mangifera indica* (Ningsih, et al., 2017). Ekstrak kental yang dimaksud adalah ketika massa ekstrak

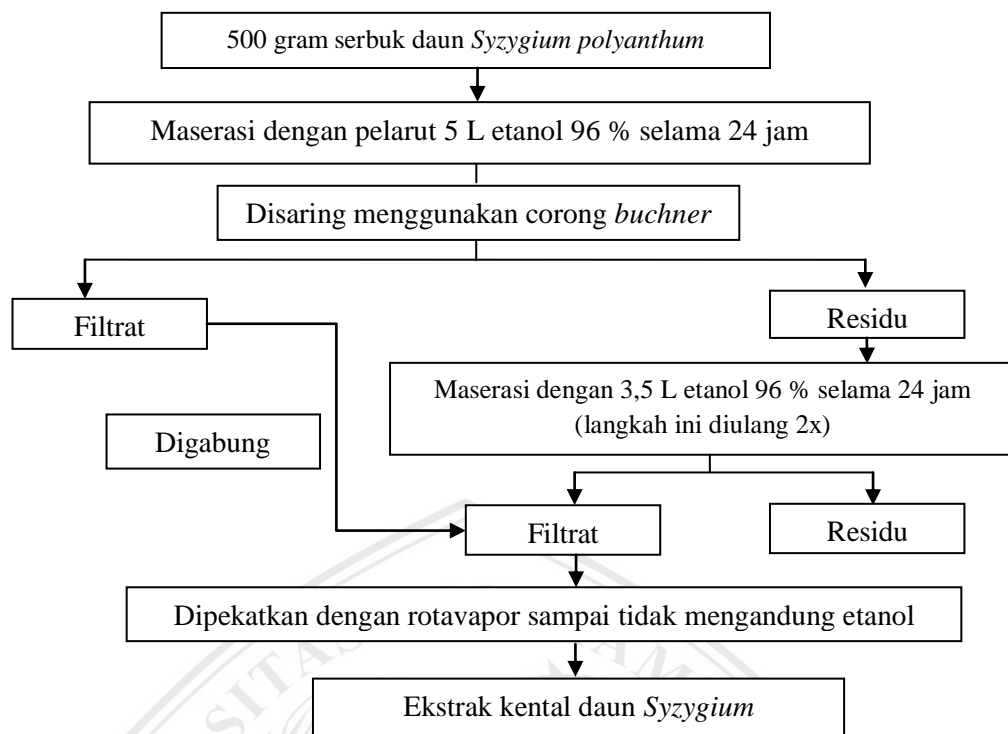
yang terbentuk sudah tidak mengandung pelarutnya yaitu etanol (Handa, et al., 2008).



Gambar 4. 1-1 Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *Mangifera indica*

4.5.2 Ekstraksi Daun *Syzygium polyanthum* W.

Daun *Syzygium polyanthum* dibersihkan, dikeringkan di bawah naungan dihaluskan menjadi serbuk simplisia, dan ditimbang sebanyak 500 mg. Dilakukan maserasi selama 24 jam di dalam bejana dengan merendamnya di dalam pelarut etanol 96% 5 L. Rendaman disaring dengan corong *buchner* yang dipisahkan antara filtrat dan residunya di dalam wadah berbeda. Lakukan maserasi kembali selama 24 jam pada residu dengan menambahkan etanol 96% 3,5 L, lakukan maserasi hingga penyaringan kembali sebanyak dua kali. Seluruh filtrat digabungkan dari setiap proses maserasi dan dilakukan pemekatan dengan *rotary evaporator* dengan parameter proses pemekatan pada suhu 60°C, titik didih 40°C, dan tekanan 175 mbar untuk mendapatkan ekstrak kental daun *Mangifera indica* (Ningsih, et al., 2017). Ekstrak kental yang dimaksud adalah ketika massa ekstrak yang terbentuk sudah tidak mengandung pelarutnya yaitu etanol (Handa, et al., 2008).



Gambar 4. 2-1 Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *Syzygium polyanthum*

4.5.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah tahap pendahuluan di dalam penelitian. Metode skrining fitokimia yang dilakukan menggunakan reaksi pengujian warna yang muncul dengan menggunakan suatu pereaksi warna (Kristianti et al., 2008). Skrining dilakukan pada penelitian adalah untuk dapat mengetahui senyawa biologis aktif yang terdapat di dalam tumbuhan dilakukan dengan penapisan fitokimia yang memiliki metode dari mulai pemisahan, pemurnian, hingga identifikasi kandungan senyawa di dalam tanaman. Hal tersebut akibat dari tanaman memiliki keragaman struktural dan juga berbagai aktivitas farmakologi yang digunakan dalam bidang Farmasi. Tanaman juga memiliki senyawa biologis aktif yang disebut fitokimia. Kandungan senyawa organik yang diidentifikasi dalam penelitian ini adalah uji Flavonoid, Alkaloid, Glikosida, Antrakinon, dan Tanin pada daun *Mangifera indica* dan daun *Syzygium polyanthum*.

Proses skrining fitokimia diawali dengan penyiapan fase diam yaitu Silica gel plat KLT G60 F254 dengan panjang 8 cm dan lebar 2 cm. Disiapkan bahan uji yaitu ekstrak etanol dari tanaman yang akan diuji sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 1 mL etanol kemudian ditotolkan pada fase diam. Fase Gerak untuk eluasi

digunakan eluen n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 8:2. Perbandingan eluen yang diambil adalah yang paling baik setelah dilakukan perbandingan dengan 4 macam konsentrasi yang berbeda, yaitu n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan (8:2); (6:4); (4:6); dan (8:2). Eluen yang baik adalah eluen yang dapat memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak. Dapat dilihat dari noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan yang lainnya jelas (Rahimah, et al., 2013).

1.5.3.1 Uji KLT Senyawa Flavonoid

Bahan uji yang telah dilarutkan ke dalam etanol kemudian ditotolkan pada plat KLT. Ditunggu hingga bahan uji menyerap dan dieluasi dengan fase gerak tersebut di atas. Setelah itu dilihat dibawah sinar tampak pada panjang gelombang 254 nm dan sinar tampak berwarna biru pada UV 365 nm. Kemudian akan memunculkan noda berwarna kuning cokelat yang menegaskan bahwa adanya kandungan flavonoid di dalam tanaman yang diuji. Reaksi positif tersebut akan lebih tampak jika dilihat setelah diberi penampak noda H_2SO_4 10% (Marliana et al., 2005).

1.5.3.2 Uji KLT Senyawa Alkaloid

Bahan uji yang telah dilarutkan ke dalam etanol kemudian ditotolkan pada plat KLT. Ditunggu hingga bahan uji menyerap dan dieluasi dengan fase gerak tersebut di atas. Setelah itu dilihat dibawah sinar tampak pada panjang gelombang 254 nm dan sinar tampak berwarna biru pada UV 365 nm. Kemudian akan memunculkan noda berwarna hijau kekuningan atau jingga kehitaman yang menegaskan bahwa adanya kandungan Alkaloid di dalam tanaman yang diuji. Reaksi positif tersebut akan lebih tampak jika dilihat setelah diberi penampak noda Dragendorff (Marliana et al., 2005).

1.5.3.3 Uji KLT Senyawa Antrakinon

Bahan uji yang telah dilarutkan ke dalam etanol kemudian ditotolkan pada plat KLT. Ditunggu hingga bahan uji menyerap dan dieluasi dengan fase gerak tersebut di atas. Setelah itu dilihat dibawah sinar tampak pada panjang gelombang 254 nm dan sinar tampak berwarna biru pada UV 365 nm. Kemudian akan memunculkan noda berwarna noda kuning, kuning cokelat, merah, ungu, hijau dan lembayung yang menegaskan bahwa adanya kandungan Antrakinon di dalam

tanaman yang diuji. Reaksi positif tersebut akan lebih tampak jika dilihat setelah diberi penampak noda KOH 10% larutan dalam metanol (Kristanti et al., 2008).

1.5.3.4 Uji KLT Senyawa Triterpenoid

Bahan uji yang telah dilarutkan ke dalam etanol kemudian ditotolkan pada plat KLT. Ditunggu hingga bahan uji menyerap dan dieluasi dengan fase gerak tersebut di atas. Setelah itu dilihat dibawah sinar tampak pada panjang gelombang 254 nm dan sinar tampak berwarna biru pada UV 365 nm. Kemudian akan memunculkan noda berwarna merah hingga ungu yang menegaskan bahwa adanya kandungan Triterpenoid di dalam tanaman yang diuji. Reaksi positif tersebut akan lebih tampak jika dilihat setelah diberi penampak noda *Lieberman-Baurchard* atau anelasdehida-asam sulfat (Marliana, 2005).

1.5.3.5 Uji KLT Senyawa Tanin

Bahan uji yang telah dilarutkan ke dalam etanol kemudian ditotolkan pada plat KLT. Ditunggu hingga bahan uji menyerap dan dieluasi dengan fase gerak tersebut di atas. Setelah itu dilihat dibawah sinar tampak pada panjang gelombang 254 nm dan sinar tampak berwarna biru pada UV 365 nm. Kemudian akan memunculkan noda berwarna hitam yang menegaskan bahwa adanya kandungan Tanin di dalam tanaman yang diuji. Reaksi positif tersebut akan lebih tampak jika dilihat setelah diberi penampak noda FeCl_3 5 % (Banu dan Nagarajan, 2014).

Tabel IV.1 Hasil Identifikasi Skrining Fitokimia

No.	Fitokimia	Pereaksi	Hasil Identifikasi
1.	Alkaloid	Dragendorff	Hijau kekuningan; jingga kehitaman
2.	Antrakinon	KOH % larutan dalam metanol	Kuning, kuning cokelat, merah, ungu, hijau dan lembayung
3.	Flavonoid	H_2SO_4 10%	Kuning cokelat
4.	Tanin	FeCl_3 5 %	Hitam
5.	Triterpenoid	Anisaldehyda-asam sulfat	Merah hingga ungu

4.5.4 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian kali ini adalah tikus jantan dewasa galur Wistar (*Rattus norvegicus*) sehat dengan berat 150-200 gram yang

diadaptasikan selama 7 hari pada suhu sekitar $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$ di dalam kandang. Selama periode aklimatisasi, tikus diberi pakan standar dan air (E. A. Ironi et al., 2016). Hewan uji kemudian dipilih secara random dan dibagi ke dalam 6 kelompok uji.

4.5.5 Pembuatan Dosis Aloksan

Tikus terlebih dahulu diinduksi Aloksan agar menderita diabetes. Pada penelitian ini akan digunakan dosis aloksan monohidrat sebesar 150 mg / kg berat badan (Osinubi, Ajayi, & Adesiyun, 2006) diberikan secara intraperitoneal ke 36 tikus albino. Sebelum itu, kadar glukosa darah puasa tikus ditentukan dahulu setelah 12 jam puasa. Setelah 48 jam diinduksi, diambil darahnya pada arteri ekor dan ditentukan kadar glukosa darahnya menggunakan *Accucheck glucometer*. Tikus dengan kadar glukosa darah puasa ≥ 126 / dl telah dianggap mengalami diabetes (Peniati, et al., 2017).

4.5.6 Penentuan Dosis Kombinasi Ekstrak Daun *Mangifera indica* dan

Syzygium polyanthum

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Syah, Suwender, dan Mulqie, (2015). Pemberian ekstrak etanol daun *Mangifera indica* pada dosis 8,4 mg/20g BB mencit dapat menurunkan kadar gula darah. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Nugraha, (2011). Pemberian ekstrak etanol daun *Syzygium polyanthum* pada dosis 720 mg/200g BB tikus dapat menurunkan kadar kolesterol dan juga gula darah secara signifikan. Sehingga pada penelitian kali ini, digunakan kombinasi dari ekstrak tanaman tersebut dengan perbandingan dosis daun *Mangifera indica* dan daun *Syzygium polyanthum* adalah sebagai berikut:

- 1 : $\frac{1}{2}$ (84 mg/200g BB : 360 mg/200g BB).
- $\frac{1}{2}$: $\frac{1}{2}$ (42 mg/200g BB : 360 mg/200g BB).
- $\frac{1}{2}$: 1 (42 mg/200g BB : 720 mg/200g BB).

4.6 Prosedur Pengujian

Tikus dibagi menjadi 6 kelompok yaitu sebagai kelompok kontrol positif (K+) dan negatif (K-), kelompok sehat (Ks), serta kelompok perlakuan 1 (P1),

perlakuan 2 (P2), dan perlakuan 3 (P3) yang masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus dalam satu kelompok pengujian:

1. Dilakukan pengadaptasian pada hewan coba selama 7 hari dengan pakan standar.
2. Setelah dilakukan adaptasi, kelompok sehat (Ks) diberikan pakan standar, K(+), K(-), P₁, P₂, dan P₃ diberikan pakan standar dan aloksan selama 10 hari untuk meningkatkan kadar glukosa darah dan diabetes pada hewan coba.
3. Kemudian dilakukan pemberian bahan uji pada masing-masing kelompok:
 - K⁺ : Kelompok kontrol positif diberi pakan standar dan reagen aloksan serta Glibenklamid 5 mg/kgBB selama 7 hari.
 - K⁻ : Kelompok kontrol negatif diberi pakan standar dan aloksan selama 7 hari.
 - Ks : Kelompok sehat diberi pakan standar tanpa ada perlakuan selama 7 hari.
 - P₁ : Kelompok uji 1 diberi pakan standar dan reagen aloksan serta kombinasi ekstrak etanol daun *Mangifera indica* dan *Syzygium polyanthum* (1 : $\frac{1}{2}$) yaitu 84 mg/200gBB : 360 mg/200gBB selama 7 hari.
 - P₂ : Kelompok uji 2 diberi pakan standar dan reagen aloksan serta kombinasi ekstrak etanol daun *Mangifera indica* dan *Syzygium polyanthum* ($\frac{1}{2}$: $\frac{1}{2}$) yaitu 42 mg/200gBB : 360 mg/200gBB selama 7 hari.
 - P₃ : Kelompok uji 3 diberi pakan standar dan reagen aloksan serta kombinasi ekstrak etanol daun *Mangifera indica* dan *Syzygium polyanthum* ($\frac{1}{2}$: 1) yaitu 42 mg/200gBB : 720 mg/200gBB selama 7 hari.
4. Dilakukan pengambilan sampel darah pada masing-masing kelompok dan diukur kadar glukosa darah.

4.7 Pengambilan Darah Hewan Uji

Pengambilan darah dilakukan pada organ jantung. Terlebih dahulu hewan uji (*Rattus norvegicus*) di inhalasi dengan kloroform menggunakan *anesthesia chamber* hingga hewan uji benar-benar tidak sadarkan diri. Kemudian diposisikan dalam keadaan terlentang. Buka rongga perut dengan membuat *V-cut* melalui kulit dan dinding perut setebal 1 cm dimulai dari ekor hingga ke tulang rusuk. Geser

usus ke kiri dan dorong hati ke bagian depan. Temukan organ jantung yang terletak di dada tikus. Gunakan jarum suntik 1 mL dan tusukkan jarum dengan hati-hati ke dalam pembuluh darah. Tarik darah secara perlahan sampai dinding pembuluh darah runtuh. Berhenti sejenak untuk membiarkan vena mengisi kembali dan kemudian ulangi tiga, empat kali atau sampai tidak ada lagi darah yang keluar dari organ jantung. Darah yang diambil adalah ± 3 mL ditampung ke dalam tabung *vacutainer* bertutup merah (Hoff, 2000).

4.8 Pengukuran Kadar Glukosa Darah Total

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik, Universitas Brawijaya dengan menggunakan metode GOD-PAP (*Glucose Oxidase – Peroxidase Aminoantipirin*). Alat yang digunakan untuk metode GOD-PAP adalah ABX *Pentra Glucose* PAP CP200 dengan reagen ditujukan untuk penentuan diagnostik glukosa in vitro secara kuantitatif di dalam serum darah. Reagen yang digunakan untuk analisis adalah:

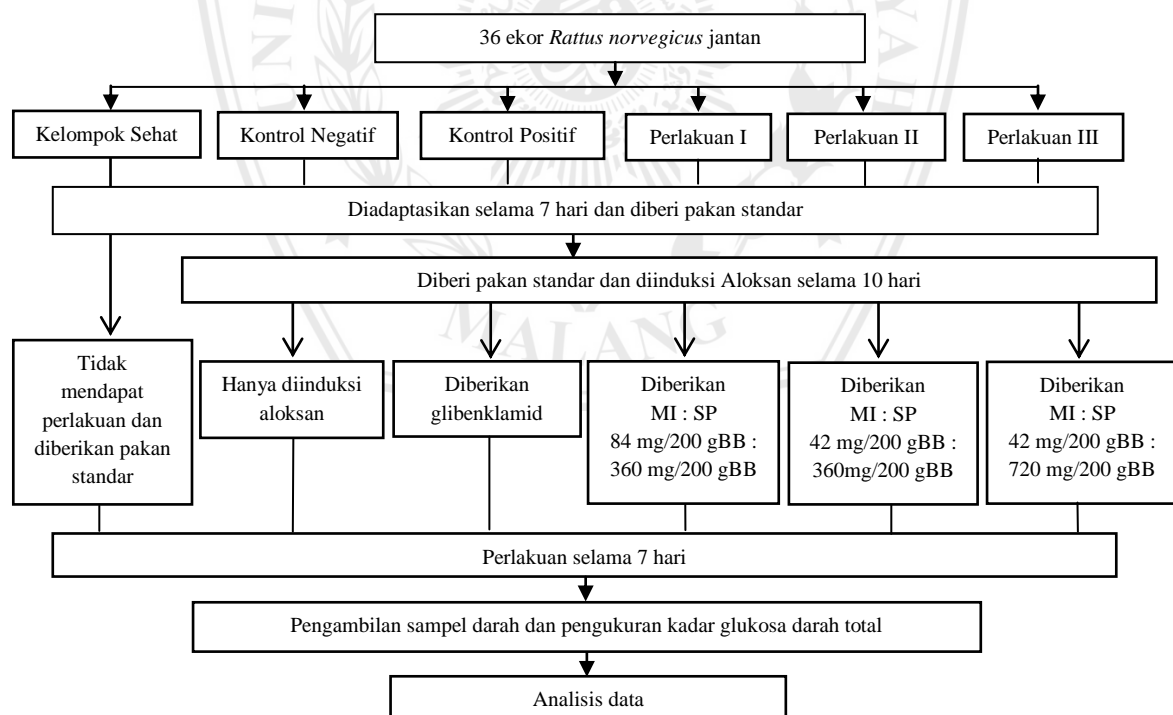
- Buffer fosfat pH 7,40 13,8 mmol/L
- Fenol 10 mmol/L
- 4-aminoantipirin 0,3 mmol/L
- Glukosa oksidase ≥ 10.000 U/L
- Peroksidase ≥ 700 U/L
- Sodium azide $< 0,1\%$

Jalankan alat dengan melepaskan tutup *cassete*, keluarkan busa dengan menggunakan pipet plastik, dan tempatkan *cassete* ke dalam kompartemen reagen *Pentra C200* yang didinginkan. Pengukuran nilai absorbansi glukosa dilakukan dengan mencampurkan 1000 μ L reagensia dengan 10 μ L sampel, inkubasi campuran selama 10 menit pada suhu 37°C dan disentrifus selama 15 menit untuk mendapatkan serum (cairan berwarna bening di permukaan atas), pindahkan serum ke dalam *appendorf*. Kemudian diukur absorbansinya dengan alat ABX *Pentra Glucose* PAP CP200. Pengukuran absorbansi tersebut dimaksudkan untuk memperoleh data berupa nominal atau angka yang menunjukkan kadar glukosa darah dalam satuan mg/dL di mana hasil kelompok perlakuan akan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

4.9 Analisa Data

Dilakukan uji homogenitas varian dari data-data yang diperoleh (data bersifat homogen jika $\text{sig} > 0,05$). Uji ANOVA Dilakukan pengolahan data menggunakan aplikasi SPSS 18.0 for windows untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari masing-masing kelompok perlakuan maka dianalisis dengan menggunakan uji *one way* ANOVA yang merupakan uji hipotesis untuk variabel numerik lebih dari dua kelompok. Dikatakan ada pengaruh yang sangat bermakna jika nilai signifikansi (sig) $< p = 0,05$. Uji ANOVA perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi ekstrak etanol daun *Mangifera indica* dan daun *Syzygium polyanthum* terhadap penurunan kadar glukosa darah total, serta uji *Post Hoc* LSD dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antar kelompok uji. Perbedaan yang diharapkan adalah berupa angka di mana jika hasil perlakuan mengalami penurunan kadar glukosa darah dibandingkan dengan kontrol negatifnya. Jika salah satu dari ketiga perlakuan memiliki penurunan kadar mendekati hasil dari kontrol positifnya, maka perlakuan tersebut memiliki dosis dengan khasiat yang paling efektif.

4.10 Alur Penelitian



Gambar 4. 3-10 Alur Rancangan Penelitian

Keterangan:
MI : *Mangifera indica*
SP : *Syzygium polyanthum*